

# FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

jc997 U.S. PTO  
10/085631  
02/28/02

## Priority Certificate of Filing of a Patent Application

**Application Number:** 101 09 917.7

**Date of Filing:** 1 March 2001

**Applicant/Owner:** Bruker Daltonik GmbH, Bremen/DE

**Title:** High Throughput of Laser Desorption  
Mass Spectra in Time-of-Flight Mass  
Spectrometers

**IPC:** G 01 N, H 01 J

The accompanying pages are a proper and exact reproduction of the original documentation of this patent application.

Munich, 31 January 2002

**German Patent and Trademark Office**

Signing for the President of the German Patent Office

Wehner



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 09 917.7

**Anmeldetag:** 01. März 2001

**Anmelder/Inhaber:** Bruker Daltonik GmbH,  
Bremen/DE

**Bezeichnung:** Hoher Durchsatz an Laserdesorptions-  
massenspektren in Flugzeitmassenspek-  
trometern

**IPC:** G 01 N, H 01 J

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. Januar 2002  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Betrieb und Ausführungsform eines Reflektor-Flugzeitmassenspektrometers für die Aufnahme von Tochterionenspektren mit einer Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI), mit einer Verbesserung des Auflösungsvermögens durch verzögertes Einschalten der Ionenbeschleunigung, mit einer Erzeugung der Tochterionen durch Zerfall nach Verlassen der Ionenquelle (Post Source Decay; PSD), mit einer Auswahl der Eltern- und Tochterionen durch einen Elternionenselektor und mit einer Nachbeschleunigung der Ionen vor Erreichen des Reflektors.

Die Erfindung besteht darin, alle im Massenspektrometer – in der Ionenquelle, im Elternionenselektor und in der Nachbeschleunigungseinheit – verwendeten periodischen Potentialfolgen so zu gestalten, dass sie unabhängig von der Masse der Elternionen und unabhängig von der erforderlichen Laserschussfrequenz in einem einmalig hergestellten elektrischen und thermischen Gleichgewicht der Versorgungseinheiten ablaufen können, dass die Potentialfolgen also in Frequenz und Spannung für alle Tochtterspektrenaufnahmen völlig gleich sind und auch zwischen den Spektrenaufnahmen (unbenutzt) ununterbrochen ablaufen. Um insbesondere eine Unabhängigkeit der verwendeten Spannungen von der Masse der Elternionen zu erreichen, muss das in der Ionenquelle verwendete Verfahren des verzögerten Einschaltens der Ionenbeschleunigung so ausgestaltet werden, dass durch eine dynamische Veränderung des Beschleunigungsfeldes nach seinem Einschalten ein Zeitfokuspunkt für Ionen einer Masse am Ort des Selektors so erzeugt wird, dass er in seiner Lage unabhängig von der Masse der Ionen ist. Die Auswahl der Elternionen erfolgt dabei lediglich durch eine leichte, aber präzise Phasenverschiebung zwischen den Spannungsperioden in der Ionenquelle, im Elternionenselektor und in der Nachbeschleunigungseinheit.

Abbildung 2

## Patentanmeldung BDAL 99/01

### Hoher Durchsatz an Laserdesorptionsmassenspektren in Flugzeitmassenspektrometern

- 5 Die Erfindung betrifft Betrieb und Ausführungsform eines Flugzeitmassenspektrometers für die Aufnahme von Primär- oder Tochterionenspektren hoher Massengenauigkeit mit Ionisierung durch Laserdesorption, insbesondere durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI), mit Verbesserung des Auflösungsvermögens durch verzögertes Einschalten der Ionenbeschleunigung, gegebenenfalls mit Erzeugung der Tochterionen durch Zerfall nach Verlassen der Ionen-
- 10 quelle (Post Source Decay; PSD) oder durch Stoßfragmentierung (Collisionally Induced Decomposition; CID), mit Auswahl der Eltern- und Tochterionen durch einen Elternionenselektor und mit Nachbeschleunigung der Ionen vor Erreichen des Reflektors.

- Die Erfindung besteht darin, zur Vermeidung von Einstellzeiten von elektrischen und thermischen Gleichgewichten alle im Massenspektrometer – in der Ionenquelle und gegebenenfalls im
- 15 Elternionenselektor und in der Nachbeschleunigungseinheit – verwendeten periodischen Potentialfolgen dauernd mit einer festen Basisfrequenz laufen zu lassen, unabhängig davon, ob in der betreffenden Periode ein Spektrum genommen wird oder nicht, wobei das Problem des Zündverzugs des Lasers durch Umschalten des Taktgebers gelöst wird. Außerdem sind die Potentialfolgen – wiederum zur Vermeidung von Einstellzeiten – so zu gestalten, dass ihre
- 20 Spannungen und Verzögerungszeiten völlig unabhängig von der Masse der Elternionen werden, was durch eine zeitliche Formung des verzögerten Abzugspulses für die Beschleunigung der Ionen erreicht werden kann.

#### *Stand der Technik*

- 25 In der Biochemie ist es oft nicht nur aus Gründen der Zeit- und Kostenersparnis wünschenswert, einen hohen Durchsatz an Analysen zu erzielen; in manchen Anwendungsgebieten erzwingt auch die Labilität der Proben eine schnelle Abfolge analytischer Vorgänge. Steht bei der kombinatorischen Chemie der Zeitgewinn bei der Analyse von Zehntausenden von Proben im Vordergrund, so ist bei der Proteomik zu beachten, dass die Proteine eines Proteoms nach ihrer
- 30 (beispielsweise gelelektrophoretischen) Trennung, Aufreinigung und weiteren Probenvorbereitung anfällig werden für oxidative, thermische oder andersartige Zersetzungen, da sie nicht mehr im Verband mit anderen Proteinen und in biologischer Lösungsumgebung vor diesen Zersetzungen geschützt sind. So sind die Tausende von Proteinen eines Proteoms nach ihrer Trennung in möglichst 24 Stunden, maximal 48 Stunden zu analysieren.

Es besteht also nicht nur Bedarf, sondern sogar Zwang für einen hohen Probendurchsatz in der biochemischen Analytik.

Für viele biochemische Analysen, ganz vorzugsweise für Proteinanalysen, werden heute Massenspektrometer eingesetzt. Im Vordergrund stehen hier Flugzeitmassenspektrometer mit einer

- 5 Ionisierung der Proben durch Laserdesorption. Heutige Massenspektrometer dieser Art sind zwar mit Probeneinlasssystemen ausgestattet, die auf Probenträgern eine Vielzahl von Proben, beispielsweise 384, 764 oder sogar 1536 Proben, aufnehmen können, der schnellen Analyse dieser Proben stehen aber noch verschiedenartige Probleme gegenüber, die einen hohen Durchsatz an Analysen verhindern. Unter diesen Problemen befinden sich sowohl technische Probleme
- 10 me der beteiligten Massenspektrometer und der benutzten Verfahren wie auch Probleme mit der reproduzierbaren Präparation der Proben für ihre Ionisierung.

- In der Proteomforschung kommt es vordringlich darauf an, die einzelnen Proteine möglichst schnell zu identifizieren, dann aber auch Differenzen zu schon bekannten Proteinen herauszuarbeiten. Die Identifizierung wird gewöhnlich durch die Messung der präzisen Massen der
- 15 durch einen enzymatischen (vorzugsweise tryptischen) Verdau entstehenden Peptide erreicht, wobei das Gemisch der Verdaupeptide einer MALDI-Analyse unterworfen wird und ein so genanntes "Fingerprintspektrum" ergibt. Die Liste der so gemessenen präzisen Massen wird dann mit Hilfe von speziellen Suchalgorithmen mit einer Proteinsequenzdatenbank verglichen, wodurch häufig bereits eindeutige Identifizierungen erhalten werden. Ergeben sich dann noch
- 20 Ungewissheiten durch Mehrdeutigkeiten oder nicht genau zugeordnete Massen, so folgt eine Untersuchung der in Frage stehenden Peptide durch eine Tochterionenanalyse, die in der Regel zu eindeutigen Antworten führen.

- Die hier meist eingesetzte Art der Flugzeitmassenspektrometrie besteht darin, Ionen einer Analytsubstanz in einer Ionenquelle in Form eines kurzen Laserpulses zu erzeugen, sie in einer
- 25 Beschleunigungsstrecke zwischen Ionenquelle und Grundelektrode auf eine hohe Energie zu beschleunigen, durch eine feldfreie Flugstrecke fliegen zu lassen und zeitaufgelöst mit einem Ionendetektor zu messen. Aus der so gemessenen Flugzeit der Ionen kann wegen gleicher Energie aller Ionen die Masse  $m$  der Ionen, genauer ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis  $m/z$ , bestimmt werden.

- 30 Anmerkung: Im Folgenden wird der Einfachheit halber immer nur von der Masse  $m$  gesprochen, auch wenn es sich in der Massenspektrometrie immer nur um die Messung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses  $m/z$  handelt, wobei  $z$  die Anzahl der Elementarladungen ist, die das Ion trägt. Da viele Ionisierungsarten, wie zum Beispiel die hier vorzugsweise benutzte matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI), ganz überwiegend nur einfach geladene Ionen liefern
- 35 ( $z = 1$ ), fällt für diese der Unterschied praktisch fort.

Da in einem einzigen MALDI-Prozess nur relativ wenige Ionen erzeugt werden, erfordert es die massenspektrometrische MALDI-Analyse einer Probe, etwa 50 bis 200 Einzelspektren zu

addieren, um ein gut auswertbares Summenspektrum zu erhalten. Es sind also durch 50 bis 200 Laserschüsse jedes Mal Ionen zu erzeugen, die jeweils unabhängig als Einzelspektrum gemessen und zum Summenspektrum addiert werden. Die oben erwähnten Probleme bestehen nun im Wesentlichen in drei Bereichen:

- 5 1) Die unten geschilderten komplizierten Potentialverläufe, die sich im Takt mit den Laserschüssen wiederholen müssen, können bisher nicht einfach für die Aufnahme der Spektren ein- und für die Vorbereitung zur nächsten Probenanalyse ausgeschaltet werden, ohne dass sich dabei eingestellte Gleichgewichte elektrischer oder thermischer Art verändern. Die Gleichgewichte allein garantieren aber eine vollkommene Reproduzierung aller Potential-  
10 verläufe, und diese wiederum sind für die Qualität der Spektren ausschlaggebend.
- 2) Es ist bisher für die Aufnahme von Tochterionenspektren notwendig, die Ionenquellenpo-  
tentiale von Probe zu Probe, ja sogar für die mehreren Tochterionenspektren aus verschie-  
denen Elternionen einer Probe, jeweils neu einzustellen, um eine optimale Massenauflösung  
15 der Elternionenselektion zu erreichen. Auch diese Justierung stört jedes Mal das einge-  
stellte Gleichgewicht der Elektronik.
- 3) Es muss erreicht werden, dass die Präparation der Proben auf den Probenträgern so gleich-  
mäßig und durch die Probe hindurch so homogen wird, dass die Vorgänge der quasi-explo-  
siven Verdampfung und Ionisierung der Probe durch den Laserschuss völlig reproduzierbar  
20 werden, dass also die 50 bis 200 Einzelspektren alle die gleiche Qualität haben und es keine  
Verschiebungen der Flugzeiten gibt.

Zur Lösung des ersten Problembereichs liegt es nahe, die Wiederholung der Potentialverläufe mit einem Grundtakt immer weiter laufen zu lassen. Der Potentialverlauf in der Ionenquelle (und alle anderen Potentialverläufe) werden aber durch den Laserschuss selbst getriggert, um die an sich dramatische Auswirkung des leicht unregelmäßigen Zündverzugs des Lasers auf die  
25 Spektren auszuschalten. Andererseits ist es auch nicht zweckmäßig, den Laser einfach in einer hohen Taktrate dauernd laufen zu lassen, nur, um die Elektronik im Gleichgewicht zu halten. Nicht nur, dass die Proben auf dem Probenträger Schaden nehmen können, auch der Laser hat nur eine begrenzte Lebensdauer, die durch einen solchen Dauerbetrieb herabgesetzt wird und mit der gerade bei Hochdurchsatzverfahren zu geizen ist.

- 30 Die durch Laserdesorption erzeugten Ionen besitzen häufig Anfangsgeschwindigkeiten, die nicht für alle Ionen gleich sind. Daher hat sich für ein hohes Massenauflösungsvermögen ein geschwindigkeitsfokussierendes Verfahren mit einem Ionenreflektor nach Mamyrin durchge-  
setzt, dem eine zweite feldfreie Flugstrecke folgt. In der Regel ist der Ionenreflektor zweistu-  
fig. In der ersten Stufe werden die Ionen stark abgebremst, in der zweiten nur schwach. In das  
35 lineare, relativ schwache Bremsfeld der zweiten Stufe des Reflektors dringen schnellere Ionen  
weiter ein als langsamere und legen daher einen längeren Weg zurück, der bei richtigem Ver-

hältnis der beiden Bremsfelder zueinander die schnellere Fluggeschwindigkeit genau kompensieren und somit das Massenauflösungsvermögen erhöhen kann.

Eine der meist verwendeten Ionenquellen benutzt die matrixunterstützte Laserdesorption zur Ionisierung (MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization). Die Analytmoleküle befinden sich in einer Matrixsubstanz eingebettet auf einer Probenträgerplatte. Die durch einen Laserlichtpuls von 1 bis 5 Nanosekunden Dauer erzeugte Wolke aus Matrix- und Analytmolekülen breitet sich adiabatisch in das umgebende Vakuum aus; die Moleküle in der Wolke erlangen dabei eine größere Streuung der Geschwindigkeiten. In der Wolke werden laufend Analytmoleküle durch Ionen des Matrixmaterials durch Protonenübertragung ionisiert, die Ionen besitzen daher nicht nur eine Streuung der Geschwindigkeiten, sondern auch eine Streuung ihrer Entstehungszeiten.

Diese gleichzeitig vorliegende Streuung der Geschwindigkeiten und Entstehungszeiten kann von einem Reflektor nicht fokussiert werden. Daher hat sich für MALDI eine weitere Methode zur Verbesserung der Massenauflösung durchgesetzt, die in einer verzögert einsetzenden Beschleunigung besteht. Das Grundprinzip für diese Erhöhung des Massenauflösungsvermögens unter Bedingungen der reinen Energiestreuung der Ionen ist schon seit über 40 Jahren bekannt. Die Methode ist in der Arbeit W. C. Wiley and I. H. McLaren, „Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution“, Rev. Scient. Instr. 26, 1150, 1955 veröffentlicht worden. Es handelt sich um eine Methode, die von ihren Autoren „time lag focusing“ (TLF) genannt wurde. Sie wird in jüngster Zeit unter verschiedenen Namen, beispielsweise "space-velocity correlation focusing" (SVCF; US 5,510,613; Reilly, Colby und King) oder „delayed extraction“ (DE; US 5,625,184; Vestal und Juhasz) auf die MALDI-Ionisierung angewandt und auch in kommerziell erhältlichen Flugzeitmassenspektrometern angeboten.

Das Grundprinzip dieser Methode ist einfach: Die Moleküle und Ionen der Wolke werden zunächst für eine kurze Zeit in einem feldfreien Raum ohne jede elektrische Beschleunigung fliegen gelassen. Die schnelleren Moleküle und Ionen entfernen sich dabei weiter von der Probenträger-Elektrode als die langsamen, aus der Geschwindigkeitsverteilung der Moleküle und Ionen ergibt sich dabei eine Ortsverteilung. In dieser Zeit wird auch die Ionisierung durch Protonierung abgeschlossen; auch die später aus den Molekülen entstandenen Ionen besitzen eine strenge Korrelation aus Geschwindigkeit und Ort. Erst dann wird die Beschleunigung der Ionen durch ein homogenes Beschleunigungsfeld mit linear abfallendem Beschleunigungspotential eingeschaltet. Die schnelleren Ionen befinden sich dann weiter von der Probenträger-Elektrode entfernt, somit auf einem etwas geringeren Beschleunigungspotential, das ihnen eine etwas geringere Endgeschwindigkeit für die Driftstrecke des Flugzeitspektrometers vermittelt als den zu Beginn langsameren Ionen. Bei richtiger Wahl der Verzögerungszeit („time lag“ oder "time delay") und des Potentialabfalls (also der Stärke des Beschleunigungsfeldes) können die zu Beginn langsameren, aber nach Beschleunigung schnelleren Ionen die zu Beginn schnelleren, aber nach Beschleunigung langsameren Ionen an einem einstellbaren Ort, dem Zeitfokus,

wieder einholen. Es werden somit Ionen in diesem Zeitfokus in bezug auf die Masse dispergiert, aber bei gleicher Masse in bezug auf die Flugzeit recht exakt fokussiert.

Die Potentiale der Ionenquelle müssen nach Abzug aller Ionen wieder auf die Potentiale zurückgestzt werden, die bei der Ionisierung durch den Laserschuss herrschen müssen.

- 5 Für ein lineares Flugzeitmassenspektrometer ohne Reflektor wird der Zeitfokus durch Wahl der Verzögerungszeit und des Potentialabfalls an die Stelle des Detektors gelegt. Damit erreicht man eine hohe Massenauflösung in einem linearen Flugzeitmassenspektrometer. Leider ist der Zeitfokus leicht massenabhängig, so dass die maximale Auflösung nur für einen Teilbereich des Spektrums erreicht werden kann und im übrigen Teil des Spektrum merklich schlechter ist.

10 Im Patent DE 196 38 577 (Franzen) ist ein Verfahren bekannt geworden, wie man die Massenabhängigkeit der Zeitfokussierung am Ort des Detektors eines linearen Massenspektrometers durch eine zeitliche Veränderung des Beschleunigungsfeldes nach Einschalten der Beschleunigung weitgehend beseitigen kann, so dass man Spektren guten Massenauflösungsvermögens über den ganzen Massenbereich hinweg erhält. Das Beschleunigungsfeld ist nach dem Einschalten des Abzugspulses nach einer stetigen Funktion zu einem Grenzwert hin zu erhöhen. Dieses Verfahren werde hier als Verfahren "mit zeitgeformtem Abzugspuls" oder auch als "Pulsform-Fokussierung" bezeichnet.

- 15 Für ein Flugzeitmassenspektrometer mit Reflektor legt man den Zeitfokus der verzögert einschaltenden Beschleunigung (ohne Anwendung der Pulsform-Fokussierung) zwischen Ionenquelle und Reflektor (US 5,654,545; Holle, Köster und Franzen), den geschwindigkeitsfokussierenden Reflektor stellt man sodann so ein, dass er die Ionen gleicher Massen, die diesen Zeitfokus gleichzeitig, aber mit leicht verschiedenen Geschwindigkeiten verlassen, wieder in Bezug auf die Geschwindigkeiten auf den Detektor zeitfokussiert. Die Fokuslänge des Reflektors für Ionen verschiedener Geschwindigkeiten ist wiederum leicht von der Masse der Ionen abhängig. Mit dem oben erwähnten Verfahren der "Pulsform-Fokussierung" kann man auch hier erreichen, dass das Massenspektrum eine gleichmäßige Schärfe über den ganzen Massenbereich besitzt. Dabei liegt der zwischen Ionenquelle und Reflektor liegende Zwischenzeitfokus allerdings nicht für Ionen aller Massen an der gleichen Stelle.

- 25 Der Reflektor des Flugzeitmassenspektrometers wird auch zur Untersuchung von Tochterionen (auch "Fragmentionen" genannt) verwendet, die durch metastabile oder stoßinduzierte Zerfälle von Ionen einer bestimmten Ausgangssorte erzeugt werden. Diese Ausgangssorte wird häufig „Mutterionen“ oder "Elternionen" genannt (englisch: „parent ions“ oder auch „precursor ions“). Anmerkung: Im Weiteren wird die Aufnahme der Massenspektren von unzerfallenen Ionen des MALDI-Prozesses als Aufnahme der "Primärspektren" bezeichnet, im gegensatz zu den Fragment- oder Tochterionenspektren. Die Primärspektren enthalten somit die Signale aller Elternionen, von denen jeweils Tochterionenspektren generiert werden können.
- 30
- 35



Im MALDI-Prozess der Ionisierung unterliegen die Ionen in der durch den Laserpuls erzeugten Dampfwolke sehr vielen Stößen, die die innere Energie der Ionen durch vielfache, aber milde Anregung von Schwingungen erhöht. Abhängig von der Energiedichte im Fokus des Laserschusses, werden eine kleinere oder größere Anzahl dieser Ionen „metastabil“, das heißt, diese Ionen zerfallen mit einer Halbwertszeit in der Größenordnung von einigen Mikrosekunden, so dass ein Nachweis der Fragmentionen im Massenspektrometer möglich wird. Ein Nachweis solcher Fragmentionen, die in der ersten feldfreien Flugstrecke des Massenspektrometers entstehen, durch den Reflektor eines Flugzeitspektrometers ist als PSD-Methode bekannt geworden (PSD = Post Source Decay). Es können die Mutterionen aber auch eine mit Stoßgas gefüllte Zelle im feldfreien Raum durchlaufen und so stoßinduzierte Fragmentionen bilden, die in gleicher Weise nachgewiesen werden können (CID = Collisionally Induced Decomposition).

Werden Fragmentionen durch einen Zerfall der Mutterionen nach der Beschleunigung erzeugt, so fliegen alle Fragmentionen weiterhin mit der gleichen Geschwindigkeit  $v$  wie ihre Mutterionen, haben aber durch ihre geringere Masse eine kleinere kinetische Energie  $E_k = mv^2/2$ . Sie dringen daher in das zweite Bremsfeld des Reflektors entsprechend ihrer geringeren kinetischen Energie weniger weit ein, kehren daher früher zurück und können am Ende der zweiten feldfreien Flugstrecke getrennt nach Masse gemessen werden.

Ein zweistufiger Ionenreflektor kann aber immer nur einen eingeschränkten Teil des gesamten Tochterionenspektrums messen. So ist es für einen sonst sehr günstigen, energie- und raumwinkelfokussierenden, gitterfreien Reflektor notwendig, das Tochterionenspektrum in beispielsweise 14 nacheinander aufgenommenen Spektrensegmenten zu messen und die Spektrensegmente dann aneinanderzustückeln. Das erhöht Probenverbrauch und Spektrenaufnahmezeit in unzumutbarer Weise. Eine Lösung ist in Offenlegungsschrift DE 198 56 014.1 A1 (Holle, Köster und Franzen) durch eine Nachbeschleunigung der Ionen durch ein plötzliches Anheben des Potentials der Ionen während ihres Fluges durch eine kleine Potentialzelle angegeben (Verfahren der Tochterionenspektrenaufnahme mit "Potentialfahrstuhl" oder "Potentiallift").

Um das Spektrum dieser Fragmentionen einer Ionensorte nicht durch andere Ionensorten und deren Zerfallsprodukte zu überlagern, ist es notwendig, die anderen Ionensorten auszublenden. Dazu benutzt man einen elektrischen Ablenkkondensator zwischen Ionenquelle und Reflektor, zwischen dessen Platten der Ionenstrahl hindurchfliegt. Durch eine Spannung an den Kondensatorplatten wird ein Ablenkkfeld erzeugt, das unerwünschte Ionen seitlich ablenkt und so davon abhält, den Ionendetektor zu erreichen. Für den Durchlass der erwünschten Ionen wird die Spannung des Kondensators kurzzeitig weggenommen, so dass diese Ionen unabgelenkt passieren können. Nach Passieren der Ionen wird die Spannung wieder eingeschaltet, weitere Ionen können nicht mehr den Detektor erreichen. Die Massenauflösung einer solchen Einrichtung liegt bei etwa  $R = 60$  bis  $80$ , das heißt, für Ionen der Masse von etwa  $1000$  atomaren Masseneinheiten ist das Durchlassfenster etwa  $12$  bis  $15$  Masseneinheiten breit.

Eine starke Verbesserung des Auflösungsvermögens kann durch bipolares Schalten erreicht werden, indem eine positive Ablenkspannung zunächst für den Durchflug der zu selektierenden Elternionen auf Null und dann auf negative Werte geschaltet wird. Das so erreichbare Auflösungsvermögen liegt (in Verbindung mit günstigen Ausführungsformen des Kondensators) bei  
5 R = 200 bis 1000, ausreichend für fast alle Anwendungsfälle. Die Versorgungseinheit für das Ablenkkfeld muss es daher erlauben, das Ablenkkfeld von einer Richtung innerhalb sehr kurzer Zeit (einigen Nanosekunden) abzuschalten und nach einem vorgegeben kurzen Schaltzeitintervall (einige Zehn Nanosekunden) in entgegengesetzter Ablenkrichtung wieder einzuschalten. Zwischen den Spektrenaufnahmen muss die Spannung wieder zurückgeschaltet werden, um für  
10 jede Spektrenaufnahme gleiche Verhältnisse zu haben.

Für ein hohes Massenauflösungsvermögen des Selektors ist es notwendig, den Zeitfokus der verzögert einschaltenden Beschleunigung genau in den Selektor zu legen. Da der Zeitfokuspunkt massenabhängig ist, muss man die Parameter der verzögert einschaltenden Beschleunigung, also die Verzögerungszeit und vor allem die Beschleunigungsfeldstärke, je nach Masse  
15 der auszuwählenden Ionen umstellen, um eine optimale Auflösung des Elternionenselektors zu bekommen. Dieses ist das zweite der oben kurz vorweg geschilderten Probleme, die noch gelöst werden müssen.

Die Ionen können durch den Ionenselektor in der ersten feldfreien Flugstrecke vor oder auch nach ihrem Zerfall selektiert werden. Die Ionen ändern bei einem Zerfall ihre Geschwindigkeit nicht (oder nur unbedeutend), so dass die Mutterionen zusammen mit ihren Tochterionen gleicher Geschwindigkeit gemeinsam selektiert werden.  
20

Besondere Anwendung findet die Aufnahme von Tochterionenspektren in der Proteomik, bei der zunächst so genannte Fingerprintspektren von Peptidgemischen aufgenommen werden, wobei die Peptidgemische jeweils durch enzymatischen Verdau eines Proteins unter Untersuchung gewonnen werden, und dann bei Bedarf und zur Bestätigung Tochterionenspektren von  
25 ausgewählten Verdaupeptiden gemessen werden. Die Verdaupeptide beispielsweise aus tryptischem Verdau haben Längen von etwa 500 bis 4000 atomaren Masseneinheiten.

Wie oben geschildert, ist es für die Güte des Elternionenselektors (englisch: precursor ion selector) ganz wesentlich, den Fokus der verzögert einsetzenden Beschleunigung genau in den  
30 Elternionenselektor zu legen. Da aber die Methode der verzögert einsetzenden Beschleunigung eine massenabhängige Fokusslänge besitzt, müssen die Einstellparameter der verzögert einsetzenden Beschleunigung, also die Verzögerungszeit und die Beschleunigungsfeldstärke, so eingestellt werden, dass der Zeitfokus für die zu selektierende Ionenmasse (von beispielsweise 500 bis 4000 atomaren Masseneinheiten) immer genau im Elternionenselektor liegt. Diese Ver-  
35 änderungen der Ionenquellenpotentiale und Schaltzeiten führt aber wieder zu Driften aller Potentiale, die bis zum Einstellen eines neuen Gleichgewichts abgewartet werden müssen, was einem hohen Probendurchsatz hinderlich ist.

Ein modernes Flugzeitmassenspektrometer hat also – wie leicht ersichtlich – eine recht komplizierte Elektronik, die viele im Takt durch den Laser getriggerte Spannungsabläufe und entsprechende Rücksetzungen liefern muss. In der Ionenquelle haben wir den zeitgeformten Abzugspuls nach einer Verzögerungszeit gegenüber dem Laserlichtblitz, und das Rücksetzen der Spannungen neben einer kontinuierlich anliegenden Gesamtbeschleunigungsspannung. Im Ionenselektor haben wir ein zeitlich äußerst präzise gesteuertes bipolares Schalten und Rücksetzen. In der Nachbeschleunigungseinheit ist wiederum ein präzise verzögertes Potentialschalten und ein zeitgeformter Abzugspuls nebst Rückschalten zu managen. Die Genauigkeitanforderungen an die Schaltzeiten sind sehr streng, sie liegen bei Bruchteilen von Nanosekunden. Die Anforderungen an die Reproduzierbarkeit der Spannungen sind ebenfalls sehr hoch, sie liegen für kritische Spannungen bei Bruchteilen eines Volts. Nach bisheriger Betriebsweise kommt erschwerend hinzu, dass die Potentiale der Ionenquelle in Abhängigkeit von der Elternionenmasse von Probe zu Probe umjustiert werden müssen.

Die Flugzeiten der Ionen müssen auf Bruchteile einer Nanosekunde genau ermittelt werden können. Diese Anforderung stellt extrem hohe Ansprüche an die Konstanz aller Zeitverzögerungen, Beschleunigungsspannungen und deren Pulsformen. Es ist bekannt, dass die thermischen Verhältnisse sowohl auf die Zeiten wie auch auf die Spannungen von Spannungsverläufe durchschlagen. Aber auch elektretische Effekte in Kondensatoren (durch sich erholende Restspannungen bewirkt) stören die Reproduzierbarkeit von elektrischen Abläufen, so lange diese nicht in recht genau gleichen Abständen wiederholt ablaufen.

Der dritte Problemkreis betrifft die homogene und reproduzierbare Präparation der Proben für die MALDI-Ionisierung. Moderne Verfahren der MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie haben inhomogene Proben in Kauf genommen und die dadurch gegebenen Probleme dadurch zu lösen versucht, dass jedes Einzelmassenspektrum aus dem Transientenrekorder ausgelesen, auf seine Güte hin überprüft, und nur bei akzeptabler Güte zum Summenspektrum hinzuaddiert wurde. Gleichzeitig wurden die Daten der Spektren mit mangelnder Güte zu einem Rücksteuern des MALDI-Prozesses verwendet. Das Rücksteuern betraf dabei sowohl die Laserenergiedichte wie auch die Auswahl der Stelle auf der Probe, die durch den Laserfokus verdampft wurde. Die Präparationen wiesen so genannte "hot Spots" auf, die besonders günstig für die Spektrenaufnahme waren. Der Aufnahmetakt für die Einzelspektren war dabei auf etwa 3 Hertz beschränkt. Für zukünftige Verfahren mit hohem Probendurchsatz ist ein solches Vorgehen nicht tragbar. Rücksteuerungen dürfen nur in Ausnahmefällen zugelassen werden.

Eine Lösung dieser Probleme ist aber auch in Sicht. Durch das Patent DE 197 54 978 (Schürenberg und Franzen) ist eine Präparationsmethode bekannt geworden, die auf besonderen Probenträgern mit hydrophilen Ankern in hydrophober Umgebung eine genaue Lokalisation und eine zugeschnidene Form der Proben mit feiner, homogener Kristallstruktur erzielt. In Verbindung mit automatischem Probentropfchenauftrag durch Pipettierroboter gelingt es, recht homogene Probenpräparationen zu erhalten, dabei ist eine extrem genaue Einhaltung von Re-

zepturen erforderlich. Eine solche Probenpräparation ist Grundlage für eine Spektrennahme mit hohem Probendurchsatz.

#### *Aufgabe der Erfindung*

- Es ist die Aufgabe der Erfindung, einen möglichst hohen Durchsatz von Primärionen- und Tochterionenspektrenmessungen mit jeweils gleich hoher, sehr guter Qualität zu erzielen.
- 5 Für dieses Ziel ist jede Störung der elektrischen oder thermischen Einstellgleichgewichte der elektronischen Versorgungseinheiten zu vermeiden, gleich ob die Störungen durch Pausen im Ablauftakt oder durch notwendige Spannungsjustierungen bedingt sind.
- Es werde vorausgesetzt, dass die Qualitätsprobleme der Spektren durch inhomogene Probenpräparationen anderweitig gelöst werden können.
- 10

#### *Beschreibung der Erfindung*

- Eine erste Grundidee der Erfindung besteht darin, den Potentialverlauf an den Beschleunigungselektroden der Ionenquelle, also den zeitverzögerten Abzugspuls mit seiner Zeitformung, gesteuert durch einen Taktgeber mit einer festen Basisfrequenz dauernd periodisch ablaufen zu lassen, unabhängig von jeder Spektrenaufnahme, und zwar so, dass der Taktgeber im Fall ohne Spektrenaufnahme den Potentialverlauf direkt triggert, im Falle einer Spektrenaufnahme aber den Laser triggert, dessen Lichtblitz dann seinerseits wiederum zum Triggern des Potentialablaufs benutzt wird. Auf diese Weise ist es möglich, ohne Verlust des Einstellgleichgewichts Pausen zu überbrücken, zum Beispiel solche Pausen, die durch das Bewegen des Probenträgers entstehen, um eine neuen Probe in den Laserfokus hineinzufahren. Es hat sich dabei herausgestellt, dass die durch den Jitter des Lasers erzeugten winzigen unregelmäßigen Phasenunterschiede von einigen Zehn Nanosekunden im periodischen Ablauf der Potentialfolgen, ja sogar längere Zeitverzüge von einigen Mikrosekunden, vernachlässigt werden können, weil sie ohne Einfluss auf das eingestellte Gleichgewicht sind.
- 15
- 20

- Der Taktgeber wird dazu beispielsweise auf eine Frequenz eingestellt, die der schnellsten Schussfrequenz des Lasers entspricht, kann aber auch auf ein mehrfaches dieser Frequenz eingestellt werden. Für die meisten MALDI-Verfahren sind etwa 20 Hertz die obere Grenze für die Schussfolge, da sonst die Proben überhitzt werden. Das Verfahren ist aber auch für wesentlich schnellere Schussfolgen einsetzbar, wenn diese nutzbringend eingesetzt werden können.
- 25
- 30

- Es ist durch diese Erfindung auch möglich, die Spektrenaufnahmefrequenz von der Basisfrequenz zu entkoppeln, indem nicht in jeder elektrischen Periode eine Spektrenaufnahme stattfindet. Beträgt die Basisfrequenz beispielsweise 20 Hertz, so kann die Frequenz der Spektrenaufnahmen auf beispielsweise 10 oder 5 Hertz herabgesetzt werden, indem nur jede zweite oder vierte Periode der Basisfrequenz benutzt wird, falls die Probe oder der Messverlauf ein solches Vorgehen erfordern. Bei einer Basisfrequenz, die einem mehrfachen der schnellsten Laserschussfrequenz entspricht, können auch Zwischenabstufungen, die nicht sofort einer Her-
- 35

abstufung um einen Faktor 2 entsprechen, eingestellt werden. Auch unregelmäßige Auswahlen der elektrischen Perioden für die Spektrenaufnahmen sind möglich. Es können auch einzelne oder mehrere Perioden ausgelassen werden, wenn das für ein Abholen von Spektren aus dem Transientenrekorder oder für das Berechnen von Rücksteuerungsmaßnahmen notwendig ist.

- 5 Schädliche Spannungsjustierungen während der Aufnahme von Primärspektren können durch die Pulsform-Fokussierung nach DE 196 38 577 vermieden werden, mit dem die simultane Zeitfokussierung aller Ionenmassen auf den Detektor und damit ein gleichmäßig gutes Massenauflösungsvermögen über das ganze Spektrum hinweg erzielt wird. Dadurch kann jede probenabhängige Justierung von Spannungen in der Ionenquelle vermieden werden. Das Verfahren
- 10 der Pulsform-Fokussierung ist damit unabdingbare Voraussetzung für einen hohen Spektrendurchsatz. Es hat sich herausgestellt, dass in vielen Fällen dazu eine relativ einfache Exponentialfunktion ausreicht (speziell bei Benutzung einer Mittelektrode wie in Abbildung 1), bei der die Spannung des Abzugspulses exponentiell in eine Grenzspannung einläuft. Ein solcher Spannungsverlauf kann mit einem einfachen R-C-Glied erreicht werden.

- 15 Im Sinne eines hohen Durchsatzes an Spektrenmessungen ist es weiterhin zweckmäßig, zunächst die Primärspektren einer großen Anzahl von Proben, vorzugsweise aller Proben, auf einer Probenplatte zu messen, dann eine Umstellung auf die Messung der Tochterionenspektren vorzunehmen, und dann, soweit analytisch erforderlich, die Tochterionenspektren dieser Proben zu messen. Um diese Verfahrensweise durchführen zu können, sind die Primärspektren
- 20 direkt nach ihrer Aufnahme (in so genannter Echtzeit) einem Expertensystem zuzuführen, das die Notwendigkeit von Tochterionenspektren ermittelt und die zugehörigen Elternmassen für die Tochterionenspektren berechnet. Die Notwendigkeit wird dabei anhand der analytischen Aufgabe definiert.

- 25 Die Tochterionenspektren werden unter Herabsetzung der Beschleunigung in der Ionenquelle mit Hilfe eines Elternionenselektors und einer Nachbeschleunigungseinheit gemessen, die beide zwischen der Ionenquelle und dem Reflektor angebracht sind. Sie können für die Aufnahme der Primärspektren aus dem Strahlengang der Ionen ausgefahren werden.

- Für die Messung der Tochterionenspektren ergibt sich die bisher nicht gelöste Aufgabe, die Justierungen der Ionenquellenspannungen von Spektrum zu Spektrum zu vermeiden. Diese
- 30 werden dadurch erzwungen, dass die Tochterionen von immer wieder anderen Elternionen gemessen werden, deren Zeitfokus jeweils in den Elternionenselektor gelegt werden muss.

- Es ist daher eine weitere Grundidee der Erfindung, durch eine neue Betriebsart der "Pulsform-Fokussierung", die bisher immer auf eine gleichmäßige Auflösung im gesamten Spektrum ausgerichtet war, den Zeitfokusort im Elternionenselektor massenunabhängig zu machen. Dadurch
- 35 wird es möglich, den Potentialverlauf des verzögert einschaltenden, zeitgeformten Abzugspulses der Ionenquelle auch für die Tochterionenspektren von Spektrum zu Spektrum ohne jede zusätzliche Justierung genau gleich ablaufen zu lassen, völlig unabhängig von der zu selektie-

renden Masse der Elternionen. Dazu muss der Abzugspuls einen zeitlich ansteigenden Potentialverlauf bekommen, der experimentell so zu ermitteln ist, dass die Massenunabhängigkeit der Fokusslage im Elternionenselektor erreicht wird. Auch hier hat sich herausgestellt, dass dazu eine relativ einfache Exponentialfunktion ausreicht, bei der die Spannung des Abzugspulses  
5 exponentiell in eine Grenzspannung einläuft. Auch dieser Spannungsverlauf kann mit einem einfachen R-C-Glied erreicht werden, dessen Zeitkonstante allerdings anders ist als die für die Aufnahme der Primärspektren. Zwischen der Aufnahme der Primär- und der Tochterionenspektren muss also zwischen den R-C-Gliedern umgeschaltet werden.

Die leichte Abhängigkeit der Fokusslänge des Reflektors von der Masse der Ionen kann durch  
10 einen zeitgeformten Abzugspuls der Nachbeschleunigungseinheit ausgeglichen werden, wie grundsätzlich in der Patentanmeldung DE 100 34 074.1 beschrieben. Auch hierdurch ergibt sich ein konstant wiederholbarer Ablauf aller Potentialverläufe ohne die Notwendigkeit einer Justierung zwischen den Spektrenaufnahmen.

Auch die Spannungsverläufe am Elternionenselektor und an der Nachbeschleunigungseinheit  
15 (dem Potentialfahrstuhl) werden mit der Basisfrequenz laufen gelassen. Für die Selektion der Massen ist die Laufzeit der Ionen von der Ionenquelle bis zum Elternionenselektor maßgebend, also der zeitliche Verzug der Durchlassperiode des Selektors gegen die Startzeit der Ionen in der Ionenquelle. Diese Veränderung der Verzögerung der Durchlassperiode gegenüber der Startzeit ist eine kleine, aber präzise Phasenverschiebung der Potentialverläufe, die ohne wesentliche Störung des elektronischen Gleichgewichts vorgenommen werden kann. Die Phasen-  
20 verschiebung beträgt nur wenige Mikrosekunden bei einer Basistaktrate von beispielsweise 50 Millisekunden; die Phasenverschiebung muss allerdings auf Nanosekunden genau eingestellt werden können.

Ähnliches gilt für die Nachbeschleunigungseinheit mit ihrem weit komplizierteren Potential-  
25 verlauf; auch hier wird nur eine geringe, aber präzise Phasenverschiebung vorgenommen.

Der Reflektor befindet sich stets auf konstantem Potential.

Die Fragmentierung der Elternionen muss aber nicht unbedingt durch die Erzeugung von metastabilen Ionen durch den MALDI-Prozess selbst initiiert werden. Es kann auch zwischen Ionenquelle und Elternionenselektor oder zwischen Elternionenselektor und Nachbeschleunigungseinheit eine mit Stoßgas gefüllte Stoßkammer eingebaut werden, die über Stoßfragmentierung (CID = Collisionally Induced Decomposition) die Tochterionen erzeugt.  
30

#### *Beschreibung der Abbildungen*

Abbildung 1 zeigt ein Beispiel eines Flugzeitmassenspektrometers, eingerichtet für die Aufnahme von Primärspektren. Der Übersichtlichkeit halber ist der Laser für die Desorption und Ionisierung der Proben weggelassen. Auf einer Trägerplatte (1) befindet sich eine große Anzahl von Proben. Die Trägerplatte befindet sich auf einem konstanten Potential von 25 Kilovolt, dem Beschleunigungspotential. Ein kurzzeitiger Laserpuls von etwa 3 Nanosekunden  
35

Dauer erzeugt eine Ionenwolke, die sich zu einer Mittelelektrode (2) hin ausbreitet. Die Mittelelektrode (2) befindet sich zunächst auch auf dem Beschleunigungspotential. Nach einer Verzögerungszeit gegenüber dem Laserpuls wird nun das Potential der Mittelelektrode (2) so geschaltet, dass die Ionen beschleunigt werden. Das Potential der Mittelelektrode (2) ist aber  
5 nicht konstant, es wird ein zeitlich geformter Abzugspuls so angelegt, dass der durch die verzögerte Beschleunigung erzeugte Zeitfokus unabhängig von der Masse der Ionen auf dem Ionendetektor (10) liegt. Nach Passieren der Mittelelektrode (2) wird die Beschleunigung der Ionen zur geerdeten Grundelektrode (3) hin vollendet. Die beschleunigten Ionen fliegen nun mit massenabhängigen Geschwindigkeiten durch die erste Flugstrecke auf den Reflektor zu, in  
10 dessen Bremsfeld (8) sie zunächst stark abgebremst werden. Im homogenen Reflektorfeld (9) werden sie geschwindigkeitsfokussiert, da die schnelleren Ionen (nicht sichtbar) ein wenig weiter eindringen, so eine längere Flugbahn haben, und die langsameren Ionen genau am Detektor (10) wieder einholen.

Abbildung 2 zeigt dasselbe Flugzeitmassenspektrometer, nunmehr aber eingerichtet für die  
15 Aufnahme von Tochterionenspektren ausgewählter Elternionen. Die Probenträgerplatte (1) befindet sich nun auf einem viel niedrigeren Potential von nur 5 Kilovolt. Auch hier bildet sich durch den Laserschuss eine Ionenwolke, die sich im Raum zwischen Trägerplatte (1) und Mittelelektrode (2) frei ausbreiten kann, weil sich die Mittelelektrode (2) zunächst auf dem gleichen Potential wie die Probenträgerplatte (1) befindet. Nach einer Verzögerungszeit findet auch hier  
20 ein Schalten des Potentials an der Mittelelektrode (2) statt. Durch Verzögerungszeit und Spannung wird dabei der Zeitfokus für Ionen einer Masse genau in den Elternionenseparator (4) gelegt, und durch die Formgebung des Abzugspulses wird dafür gesorgt, dass dieser Fokuspunkt unabhängig von der Masse an der gleichen Stelle liegt. Der Elternionenselektor (4) ist zunächst so geschaltet, dass alle Ionen seitlich abgelenkt werden und den Detektor (10) nicht  
25 erreichen können. Nähern sich aber nun die ausgewählten Elternionen (zusammen mit den aus ihnen entstandenen Tochterionen, die mit der gleichen Geschwindigkeit fliegen), so wird die Ablenkspannung ausgeschaltet. Nach Durchflug der erwünschten Ionen wird die Ablenkspannung in entgegengesetzter Richtung wieder eingeschaltet, dadurch werden Ablenkungen im Streufeld beim Anflug hier wieder im Abflug kompensiert. Die Elternionen und ihre Tochterio-  
30 nen treten dann in den Potentiallift (5) ein. Sind sie eingetreten, so wird das Potential des Lifts (5) und der Mittelelektrode (6) um 20 Kilovolt erhöht. Die Ionen passieren nun den Potentiallift (5) und treten in den Raum zwischen Lift (5) und der Mittelelektrode (6) ein. Sodann wird die Mittelelektrode (6) mit einem Abzugspuls geschaltet, der den Beginn der Beschleunigung einleitet und eine Zeitfokussierung am Detektor (10) ergibt. Die weitere Beschleunigung findet  
35 zwischen Mittelelektrode (6) und Grundelektrode (7) statt. Eine Formgebung des Abzugspulses macht den Ort dieser Zeitfokussierung massenunabhängig. Der Reflektor dient jetzt als Tochterionenanalysator, da die Tochterionen eine massenproportional geringere Energie haben



als ihre Eltern. Es werden dabei alle Tochterionen von kleinsten Massen bis zur Masse der Elternionen in einer einzigen Spektrenaufnahme gemessen.

Abbildung 3 zeigt einen Ionenselektor, der als Kondensatorgitter nach Bradbury-Nielsen ausgelegt ist.

## 5 Besonders bevorzugte Ausführungsformen

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform wird hier auf das besondere Anwendungsgebiet der Proteomik ausgerichtet, ist aber für den Fachmann leicht auf andere Anwendungsgebiete umsetzbar.

10 Auf eine Probenträgerplatte in der Größe einer Mikrotiterplatte mit beispielsweise 384 hydrophilen Probenstellen in jeweils hydrophober Umgebung (DE 197 54 978; Schürenberg und Franzen) werden zunächst die Verdaupeptidgemische aus vielen Proteinen aufgebracht, jeweils versehen mit einer präzise abgemessenen Menge an sauberer Matrixsubstanz für die nachfolgende MALDI-Ionisierung. Die Gemische wurden durch enzymatischen Verdau je eines Proteins gewonnen, beispielsweise durch einen tryptischen Verdau. Die Proteine entstammen beispielsweise einer 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung eines Proteoms, also aller Eiweiße einer Zellgewebeat. Das gesteuerte Trocknen der aufpipettierten Probentröpfchen ergibt homogene Kristallgemische, die die Analytsubstanzen, also jeweils alle Peptide der Verdauemische, gleichmäßig verteilt enthalten.

20 Die Probenträgerplatte wird in das Flugzeitmassenspektrometer eingebracht. Es werden nun zunächst die Primärspektren gemessen, hier die so genannten Fingerprintspektren der Proteine, das sind die Spektren der Verdauemische, die die Massen der einzelnen Verdaupeptide zeigen.

15 Dazu wird in der ersten Beschleunigungsstrecke der Ionenquelle zwischen der Probenträgerplatte (1) und der Mittelelektrode (2) ein verzögerter, zeitgeformter Abzugspuls so gewählt, dass im Spektrum von leichten bis zu schweren Ionenmassen eine gleichmäßige, hohe Schärfe der Ionensignale mit gutem Massenauflösungsvermögen erhalten wird. Die Beschleunigung der Ionen beträgt hier für gewöhnlich 20 bis 30 Kilovolt. Die gleichmäßige Schärfe erlaubt eine gute Massenbestimmung für alle Ionenmassen des Spektrums.

30 Für die Pulsformung mit einem zeitlichen Ansteigen der Beschleunigungsfeldstärke hat sich eine Exponentialfunktion, die sich an einen Grenzwert anschleicht, bestens bewährt. Diese exponentielle Änderung der Spannung zwischen Probenträgerplatte (1) und Mittelelektrode (2) folgt der folgenden Funktion:

$$U_1 = V_1 \cdot \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) \right\},$$

35 wobei die Beschleunigungsspannung  $U_1$  zur Zeit  $t = 0$  einsetzt und sich mit der Zeitkonstante  $\tau_1$  dem Grenzwert  $V_1$  annähert. Eine solche Exponentialfunktion kann leicht durch eine elektrische Kondensatorschaltung (ein so genanntes R-C-Glied) ohne komplizierte weitere Steuerung



hergestellt werden. Die Verzögerungszeit, das Grenzpotential  $V_1$  und Zeitkonstante  $t_1$  werden experimentell ermittelt.

Es ist dabei zu bemerken, dass durch den zeitgeformten Abzugspuls auch die Beschleunigungsspannung zwischen Mittelelektrode (2) und Grundelektrode (3) zeitlich verändert wird, erst das  
5 Zusammenwirken beider Beschleunigungsstrecken mit ihren zeitabhängigen Beschleunigungen bewirkt die Massenunabhängigkeit der Fokuslänge. Die Massenskala, die in einem einfachen Flugzeitmassenspektrometer eine lineare Funktion der Masse vom Quadrat der Flugzeit sein sollte, wird durch die Anfangsgeschwindigkeit der Ionen aus dem MALDI-Prozess und durch diese Zeitformung des Abzugspulses leicht gekrümmt und muss daher experimentell bestimmt  
10 werden. Diese experimentell aufgenommene Kalibrierkurve wird für die Berechnung der Massen aus den Flugzeiten verwendet.

Bereits für diese Aufnahmen der Fingerprintspektren werden die Potentialverläufe in der Ionenquelle in einem gleichmäßigen Basistakt betrieben, unabhängig davon, ob gerade ein Spektrum aufgenommen wird oder nicht. Dieser Takt für die Potentialperioden wird beispielsweise  
15 auch beibehalten, wenn die Probenträgerplatte verfahren wird, um eine andere Probe in den Laserfokus zu bringen. Ist die Probe im Laserfokus angekommen, so kann die Spektrenaufnahme beginnen. Der Taktgeber, der die Potentialperiode triggerte, wird nun auf das Triggern des Lasers umgeschaltet, der Laser zündet, erzeugt MALDI-Ionen und triggert seinerseits nun den Potentialablauf in der Ionenquelle und die Spektrenaufnahme mit einem addierenden Transientenrekorder. Aufeinanderfolgende Perioden ergeben jeweils Einzelspektren, die zu den  
20 vorhandenen Spektren synchron hinzuaddiert werden. Als Ergebnis erhält man ein Summenspektrum aus einer vorgewählten Anzahl von Einzelspektren, beispielsweise 50 oder 100 Einzelspektren.

Nach Beendigung der Spektrenaufnahme für eine Probe, also der Aufnahme und Summierung der beispielsweise 100 Einzelspektren, wird der Trigger wieder auf den Taktgeber umgeschaltet, das Summenspektrum wird abgeholt und seiner Verarbeitung zugeführt, und die nächste Probe wird in den Laserfokus gefahren.  
25

Das Summenspektrum, das codiert in seinen Ionensignalen die Flugzeiten (und Intensitäten) der Ionen enthält, wird währenddessen durch Signalverarbeitung und durch Benutzung einer  
30 Kalibrierkurve in eine Liste der Ionenmassen und Ionenintensitäten umgerechnet und einem Expertensystem zugeführt, das eine Identifizierung des Proteins anhand von Spektrendatenbanken oder von Proteinsequenzdatenbanken übernimmt. Im Falle von nicht-eindeutigen Identifizierungen oder von Unstimmigkeiten beliebiger Art, beispielsweise durch ein Peptid, das nicht der erwarteten Masse entspricht, wird für diese Probe die Aufnahme von Tochterionenspektren von einem oder mehreren der Peptide vorgesehen, wobei das Expertensystem auch  
35 die Peptide festlegt, von denen diese Tochterionenspektren genommen werden sollen.

Sind alle Proben der Probenträgerplatte vermessen, so wird die Messung der Tochterionenspektren vorbereitet. Die Fingerprintspektren der Verdauemische wurden mit einer sehr geringen Laserenergiedichte im Laserfokus gemessen, um möglichst wenig Ionenfragmentierung zu erzeugen. Durch Rücknahme der Laserlichtabschwächung in einem steuerbaren Abschwächer wird jetzt die Energiedichte im Fokus erhöht, um für die Tochterionenspektren die Zahl der metastabilen Ionenzerfälle zu erhöhen. Die hohe Beschleunigungsspannung in der Ionenquelle wird auf eine niedrige Beschleunigungsspannung von etwa drei bis sechs Kilovolt zurückgefahren. Dabei wird die Spannungsversorgung der Ionenquelle auf die neuen Werte eines verzögerten, zeitgeformten Abzugspulses umgestellt. Dabei kann kann beispielsweise die Zeitkonstante der Exponentialfunktion durch Umschalten des R-C-Glieds umgestellt werden.

Zudem werden der Elternionenselektor und die Nachbeschleunigungseinheit in den Strahlengang der Ionen eingefahren. Da diese durch ihre Gitter den Ionenstrahl leicht abschwächen, waren sie aus dem Strahlengang für die Aufnahme der Fingerprintspektren entfernt.

Auch die periodischen Potentialverläufe am Ionenselektor und an der Nachbeschleunigungseinheit werden eingeschaltet. Vor der Tochterionenspektrenaufnahme wird jetzt einige Minuten gewartet, um alle elektronischen Versorgungseinheiten in ihr neues elektrisches und thermisches Gleichgewicht zu bringen. Erst dann beginnt die Tochterionenspektrenaufnahme der ersten Probe.

Nach jeder Tochterionenspektrenaufnahme wird zunächst vom Rechner bestimmt, welche Elternionenmasse für das nächste Tochtterspektrum gefordert ist. Über Kalibrierkurven werden die dazu gehörigen Phasenverschiebungen für die Potentialabläufe am Selektor und an der Nachbeschleunigungseinheit bestimmt und eingestellt. Erst dann wird die Probe in den Laserfokus gefahren und die Spektrennahme begonnen. So können sich winzige Ungleichgewichte, die durch die Phasenänderung vorkommen könnten, noch ausgleichen.

Die gegenüber den Fingerprintspektren erhöhte Laserenergiedichte erzeugt eine wesentlich höhere Anzahl von metastabilen Ionen pro Laserschuss, also von Ionen, die noch im Massenspektrometer zerfallen. Die nach der Beschleunigungsstrecke (1, 2, 3), aber vor der Nachbeschleunigungseinheit (5) zerfallenden Ionen können als Tochterionen nachgewiesen werden. Die höhere Ionendichte stört etwas das Massenauflösungsvermögen; da jedoch für Tochterionenspektren nicht eine so hohe Massengenauigkeit erforderlich ist wie für Fingerprintspektren, ist das hier nicht hinderlich.

Eine optimale Ausführungsform eines Elternionenselektors (4) beruht auf einem Kondensatorgitter in Anordnung nach Bradbury-Nielsen (Abbildung 3), das statt eines einfachen Kondensators im Flugzeitspektrometer eingesetzt ist.

Die Spannung an den Kondensatorplatten dieses Gitters wird zu einer Zeit  $t_2$  ausgeschaltet, zu der die erwünschten Ionen gerade in das Hauptablenkfeld der einzelnen, parallelen Ablenk-kondensatoren eintreten. Das Bündel der erwünschten Ionen wird dadurch überhaupt nur im

schwachen Streufeld abgelenkt. Die Spannung muss mit umgekehrter Polarität zu einer Zeit  $t_3$  wieder eingeschaltet werden, zu der die Ionen gerade aus dem Hauptablenkfeld wieder austreten. Die leichte Ablenkung aus dem Eingangsstreufeld wird dann im Ausgangsstreufeld wieder rückgängig gemacht. Unerwünschte Ionen, die sich in Abständen von nur einigen Zehntel Millimeter vor oder hinter den erwünschten Ionen befinden, erleben hier bereits eine Gesamtablenkung, die sie vom Erreichen des Detektors abhält.

Der Selektor (4) sperrt also normalerweise den geraden Weg der Ionen, die Ionen werden leicht seitlich abgelenkt und können den Ionendetektor (10) nicht erreichen. Zu dem Zeitpunkt, zu dem die auszuwählenden Ionen (in unserem Beispiel die Ionen eines bestimmten Peptids) im Selektor (4) ankommen, hat der Selektor gerade durch Abschalten der Ablenkspannung den geraden Durchgang freigegeben. Die unzerfallenen Elternionen wie auch die gleich schnell fliegenden Tochterionen (und deren neutrale Gegenbruchstücke) fliegen nun durch den Selektor hindurch. Sind sie soeben hindurchgeflogen, macht der Selektor (4) durch Einschalten der Ablenkspannung entgegengesetzter Polarität den geraden Durchgang wieder zu. Beim zeitlichen Durchflug der erwünschten Ionen durch den Selektor sind die Ionen durch die Zeitverzögerung, die Spannung und die besondere Form des Abzugspulses in der Ionenquelle alle zeitfokussiert; sie passieren den Selektor alle zur gleichen Zeit. So wird ein hohes Massenauswahlvermögen erhalten.

Die erwünschten und ausgewählten Ionen fliegen nun nach einer weiteren kleinen feldfreien Flugstrecke in die Nachbeschleunigungseinheit ein. Sind sie in ihrem Flug gerade in den kleinen, umschlossenen Raum des Potentialfahrstuhls eingetreten, so wird das Potential dieses Fahrstuhls sehr schnell auf ein Nachbeschleunigungspotential angehoben. Beim Verlassen des Fahrstuhls oder Lifts erleben sie (zwischen zwei oder drei Gittern) eine Nachbeschleunigung, die ihnen eine zusätzliche kinetische Energie von beispielsweise 20 Kiloelektronenvolt vermittelt. Dabei kann durch ein verzögertes Einschalten der Nachbeschleunigung zwischen Fahrstuhl (5) und Mittelelektrode (6) wiederum eine zeitliche Fokussierung für Ionen einer Masse, jedoch leicht verschiedener Geschwindigkeit erreicht werden. Durch eine pulsgeformte Veränderung der Spannung nach dem Einschalten kann auch hier eine Massenunabhängigkeit der Fokussierung und damit eine gute Massenauflösung über den gesamten Massenbereich hinweg erzielt werden. Bei einer Beschleunigung in der Ionenquelle von fünf Kilovolt und einer Nachbeschleunigung von 20 Kilovolt haben die Tochter- und Elternionen jetzt kinetische Energien zwischen minimal 20 bis maximal 25 Kilovolt, je nach ihrer Masse. Sie können alle vom Reflektor (8, 9) reflektiert und im Detektor (10) in einer einzigen Spektrenaufnahme gemessen werden. Im Tochterionenspektrum sind so also alle Tochterionen von kleinsten Massen bis zur Elternionenmasse vorhanden.

Im Allgemeinen werden gute Fingerprintspektren wie auch gute Tochterionenspektren mit jeweils 100 Einzelspektren gewonnen. Bei einer Basisfrequenz für die Spektrenaufnahme von 20 Hertz braucht eine Spektrenaufnahme etwa fünf Sekunden. Rechnet man jeweils eine halbe

Sekunde für das Verfahren der Probe und für das Abholen der Spektrendaten aus dem Transientenrekorder, so werden für jede Spektrennahme, gleich ob für ein Fingerprint- oder ein Tochterionenspektrum, etwa 6 Sekunden benötigt. Werden für jede Probe genau ein Fingerprintspektrum und im Durchschnitt zwei Tochterionenspektren (von durchschnittlich zwei verschiedenen Peptiden) gemessen, so erfordert das etwa zwei Stunden für 384 Proben einer Probenplatte. Mit einer Automatik zum Nachlegen und Laden der Probenträgerplatten können in 24 Stunden etwa 4600 Proben gemessen werden, wobei insgesamt etwa 13800 Spektren erhalten werden.

Die Probenmenge in den einzelnen Probenpräparationen reicht im Allgemeinen jeweils für ein Primärspektrum und zwei bis drei Tochterionenspektren aus. Sollen mehr Tochterionenspektren gemessen werden, so empfiehlt es sich, auf eine Probenträgerplatte von einer Probe jeweils mehrere Tröpfchen auf mehrere hydrophile Anker aufzutragen.

Es hat sich gezeigt, dass bestimmte Proben einen Beschuss mit erhöhter Laserenergiedichte und 20 Hertz Wiederholrate nicht vertragen. Die Proben erhitzen sich zu stark und leiden an Zersetzungen der Probe in der MALDI-Präparation auf der Probenplatte. In diesem Fall kann die Laserschussrate auf zehn oder fünf Hertz herabgesetzt werden, ohne dass die Basisfrequenz der Potentialperiode in der Ionenquelle, im Selektor und in der Nachbeschleunigungseinheit verändert werden müsste. Die Herabsetzung der Laserschussrate ist oben geschildert.

Es hat sich dabei gezeigt, dass sich ein solcher Betrieb gar nicht einmal auf die Gesamtdauer der Spektrenaufnahme auswirken muss. Eine Probe, die ein Herabsetzen der Laserschussfrequenz auf zehn Hertz erfordert, liefert auch häufig eine erhöhte Ausbeute an metastabilen Ionen; es reicht damit eine Summierung von nur 50 Einzelspektren aus und die Aufnahmezeit bleibt gleich. Das gilt jedoch nicht für alle Arten von Proben.

Eine Variante des Messverfahrens für Tochterionenspektren nimmt erst einmal nur die Summe aus jeweils etwa 10 Einzelspektren. Dieses erste Summenspektrum wird auf seine Qualität untersucht und führt gegebenenfalls zu einer Rückregelung, beispielsweise zu einer leichten Veränderung der Laserenergiedichte. Wird dieser Rückregelungsvorgang ein- bis zweimal pro Tochterionenspektrum ausgeführt, so erhöht sich die Spektrenaufnahmenzeit etwa um drei Sekunden, die Anzahl von Proben geht von 4600 auf etwa 3000 Proben mit insgesamt 9000 Spekten pro 24 Stunden herunter. Gegenüber bisherigen Rückregelungsverfahren, die bei etwa 3 Hertz Aufnahmetakt 40 Sekunden Aufnahmedauer für das Summenspektrum benötigen, ist das ein großer Fortschritt.

In einem Proteom befinden sich etwa 3000 bis 10000 trennbare und erkennbare Proteine. Die Proteine sind allerdings nach ihrer Trennung sehr empfindlich gegen Oxidationen und Zersetzungen, sie müssen möglichst innerhalb von 48 Stunden verarbeitet sein. Rechnet man 24 Stunden allein für die Probenaufbereitung, so reichen mit dieser Erfindung nunmehr wenige parallel eingesetzte Massenspektrometer für eine solche Proteomanalyse aus.

Werden die Ionen nicht bereits durch den MALDI-Erzeugungsvorgang genügend metastabil, so können sie optional auch in einer gasgefüllten Stoßzelle fragmentiert werden, die sich entweder zwischen der Grundlektrode (3) der Ionenquelle und dem Elternionenselektor (4) oder zwischen dem Elternionenselektor (4) und dem Potentiallift (5) befinden kann.

- 5 Selbstverständlich können auch ganz andere Ausführungsformen von Flugzeitmassenspektrometern mit der erfindungsgemäß dauerbetriebenen Elektronik und mit der erfindungsgemäß massenunabhängigen Einstellung der Potentialabläufe ausgestattet werden, beispielsweise Flugzeitspektrometer mit mehr als einem Reflektor. Jedem massenspektrometrisch tätigen Fachmann werden in Kenntnis dieser Erfindung solche Anpassungen möglich sein.

## Ansprüche

1. Verfahren für die Hochdurchsatzmessung von Laserdesorptionsmassenspektren in einem Flugzeitmassenspektrometer mit verzögertem Einschalten des Abzugspulses für die Ionen, dadurch gekennzeichnet,  
5 dass die eigentlich nur für Spektrenmessungen zu schaltenden Potentialverläufe im Takt einer Basisfrequenz dauernd periodisch ablaufen, wobei ein Taktgeber die Potentialverläufe ohne Spektrenmessung direkt triggert, bei Spektrenmessungen hingegen den Laser triggert, dessen Lichtpuls dann seinerseits die Potentialverläufe triggert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für die Primärspektren ein  
10 gleichmäßiges Massenauflösungsvermögen über den gesamten Aufnahmebereich des Massenspektrums hinweg durch eine Zeitformung des verzögerten Abzugspulses in der Ionenquelle erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass für die Aufnahme von Tochterionenspektren ein Reflektor-Flugzeitmassenspektrometer, ein Elternionenselektor und eine  
15 Nachbeschleunigungseinheit benutzt werden, wobei auch die Potentialverläufe von Elternionenselektor und Nachbeschleunigungseinheit im Takt der Basisfrequenz dauernd periodisch ablaufen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass durch einen verzögerten Abzugspuls in der Ionenquelle eine Zeitfokussierung der Ionen jeweils einer Masse genau im  
20 Elternionenselektor stattfindet, und dass durch eine Zeitformung des verzögerten Abzugspulses der Ort der Zeitfokussierung keine Massenabhängigkeit aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass durch eine Zeitformung eines verzögerten Abzugspulses in der Nachbeschleunigungseinheit ein gleichmäßiges Auflösungsvermögen über den gesamten Aufnahmebereich des Tochterionenmassenspektrums  
25 hinweg erreicht wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass zunächst die Primärspektren einer grossen Anzahl von Proben, die auf einem Probenträger aufgebracht sind, gemessen werden, wobei die Primärspektren der Proben jeweils einem Expertensystem  
30 zugeführt werden, welches die Notwendigkeit der Aufnahme von Tochterionenspektren und die zugehörigen Elternionen bestimmt, dass danach das Massenspektrometer auf die Messung von Tochterionenspektren umgestellt wird und die als notwendig erkannten Tochterionenspektren dieser Proben gemessen werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die  
35 Zeitformung der Abzugspulse einer einfachen Exponentialfunktion folgt, die einem Grenzwert zustrebt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der zeitgeformte Abzugspuls auf eine Mittelelektrode vor einer auf Massepotential liegenden Grundelektrode wirkt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zeitformung der Abzugspulse durch einfache R-C-Glieder erzeugt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass für eine Spektrenaufnahme nicht jede der Perioden der Potentialverläufe benutzt wird.
- 5 11. Verfahren für die Messung von Tochterionenspektren in einem Reflektor-Flugzeitmassenspektrometer, mit einem Elternionenselektor zwischen Ionenquelle und Reflektor, mit gepulster Ionisierung von Analytsubstanzen auf einem Probenträger durch Laserdesorption und mit einem verzögert einschaltenden, zeitgeformten Abzugspuls,  
*dadurch gekennzeichnet,*  
10 dass der durch Einschaltverzögerungszeit und Beschleunigungsfeldstärke erzeugte Zeitfokuspunkt für Ionen einer Masse im Elternionenselektor liegt und dass durch Zeitformung des Abzugspulses die Zeitfokuspunkte für Ionen verschiedener Massen unabhängig von der Masse an gleicher Stelle liegen.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der zeitliche Anstieg einer  
15 einfachen Exponentialfunktion folgt, die einem Grenzwert zustrebt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Ionen nach Durchlaufen des Elternionenselektors in einer Nachbeschleunigungseinheit nachbeschleunigt werden.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Ionen auch in der Nachbeschleunigungseinheit durch einen zeitgeformten Abzugspuls beschleunigt werden.  
20
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass für die Einstellung und das Halten eines elektrischen und thermischen Gleichgewichts in den Versorgungseinheiten die Potentialperioden in der Ionenquelle, im Elternionenselektor und gegebenenfalls in der Nachbeschleunigungseinheit mit einer Basisfrequenz dauernd wiederholt werden, unabhängig davon, ob in der betreffenden Periode eine Spektrenaufnahme stattfindet oder nicht.  
25
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass für die Auswahl der Elternionen für die Tochtterspektrenaufnahme nur die Phasenwinkel zwischen den Potentialperioden in der Ionenquelle, im Elternionenselektor und gegebenenfalls in der Nachbeschleunigungseinheit eingestellt werden.  
30
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass nicht jede Periode der Basisfrequenz zu einer Ionisierung und einer Spektrenaufnahme benutzt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Ablenkfeld des Elternionenselektors für den Durchlass der erwünschten Ionen auf Null und  
35 nach einem Schaltzeitintervall auf entgegengesetzte Feldpolarität geschaltet wird.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Länge des Schaltzeitintervalls umgekehrt proportional zur Geschwindigkeit der erwünschten Ionen gewählt wird.
20. Flugzeitmassenspektrometer mit einer Ionisierung der zu analysierenden Proben durch Laserdesorption, mit einem elektronischen Generator für einen gegenüber dem Laserpuls verzögerten Abzugspuls, und mit einem Taktgeber für die Triggerung des Lasers während der Spektrenaufnahmen,  
5       *dadurch gekennzeichnet,*  
      dass der Taktgeber einen Umschalter von der Triggerung des Lasers auf die direkte Triggerung des elektronischen Generators für den verzögerten Abzugspuls besitzt.
- 10   21. Flugzeitmassenspektrometer nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass es mit einem Reflektor und einem Elternionenselektor ausgestattet ist, und dass auch die zeitverzögerte Triggerung des Elternionenselektors von der Triggerung durch den Laserpuls auf die direkte Triggerung durch den Taktgeber umgeschaltet werden kann.
- 15   22. Flugzeitmassenspektrometer nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass es mit einer Nachbeschleunigungseinheit für die Ionen ausgestattet ist, und dass auch die zeitverzögerte Triggerung der Nachbeschleunigungseinheit von der Triggerung durch den Laserpuls auf die direkte Triggerung durch den Taktgeber umgeschaltet werden kann.
- 20   23. Flugzeitmassenspektrometer nach einem der Ansprüche 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Elternionenselektor und gegebenenfalls die Nachbeschleunigungseinheit aus dem Strahlengang der Ionen ausgefahren werden kann.



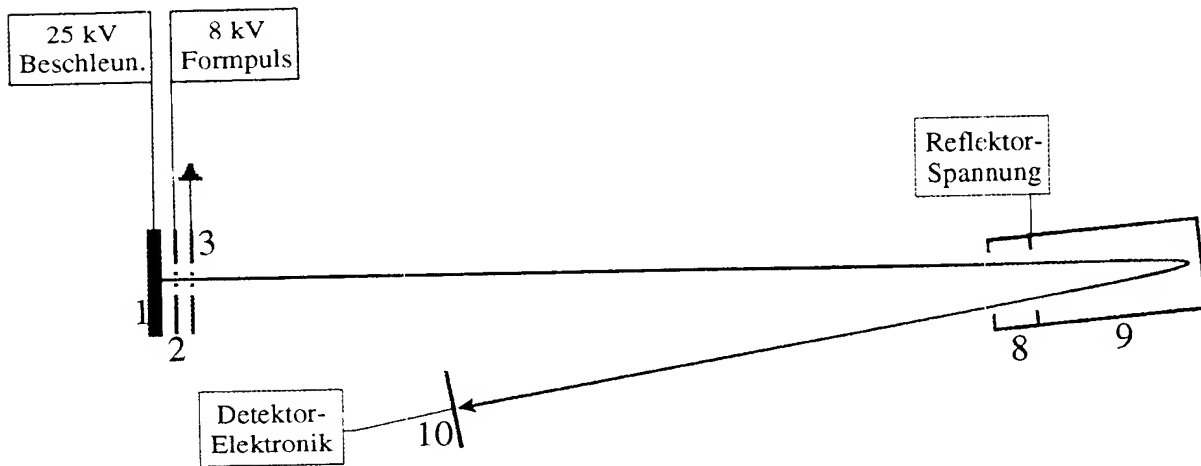


Abbildung 1

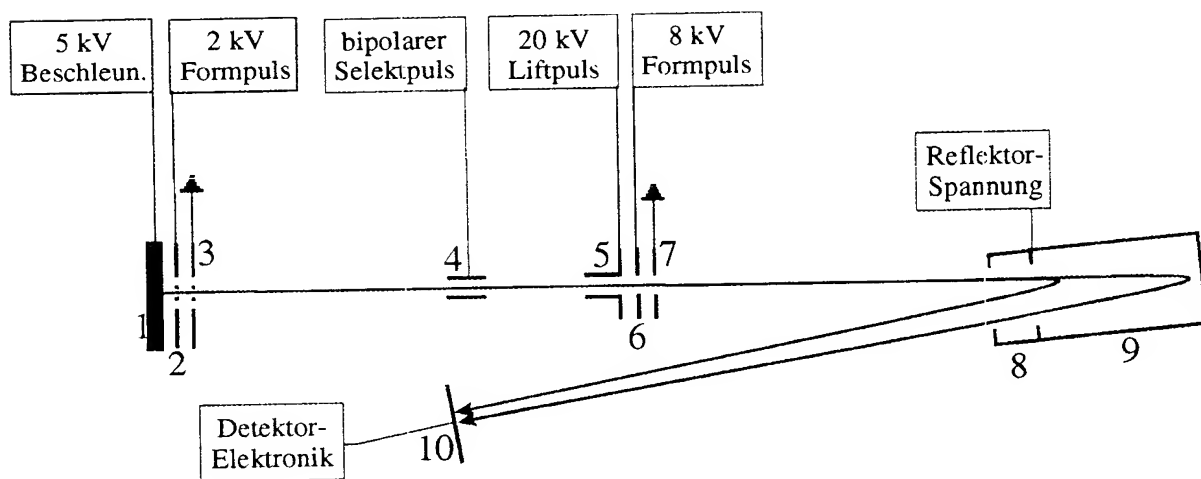


Abbildung 2

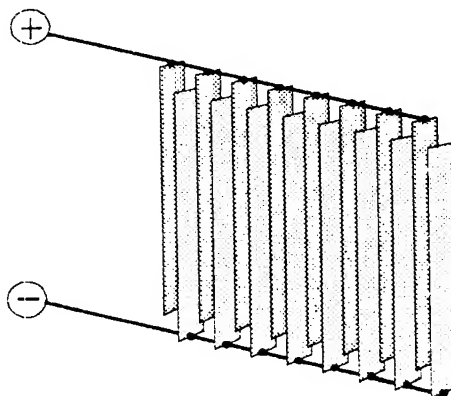


Abbildung 3